



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 55 605 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
C 12 N 9/02
C 12 N 15/53

②① Aktenzeichen: 199 55 605.9
②② Anmeldetag: 18. 11. 1999
④③ Offenlegungstag: 23. 5. 2001

DE 199 55 605 A 1

⑦① Anmelder:
BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

⑦④ Vertreter:
Kinzebach und Kollegen, 81679 München

⑦② Erfinder:
Hauer, Bernhard, Dr., 67136 Fußgönheim, DE;
Pleiss, Juergen, Dr., 71679 Asperg, DE;
Schwaneberg, Ulrich, 71336 Waiblingen, DE;
Schmitt, Jutta, Dr., 70563 Stuttgart, DE; Fischer,
Markus, 71638 Ludwigsburg, DE; Schmid, Rolf,
Prof. Dr., 70329 Stuttgart, DE; Li, Quing-Shan, Dr.,
Kyoto, JP

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Neue Cytochrom P450-Monooxygenasen und deren Verwendung zur Oxidation N-heterocyclischer Aromaten
- ⑤⑦ Die Erfindung betrifft neue Cytochrom P450-Monooxygenasen, welche zur Oxidation N-heterocyclischer aromatischer Verbindungen befähigt sind, dafür kodierende Nukleotidsequenzen, diese Sequenzen enthaltende Expressionskonstrukte und Vektoren, damit transformierte Mikroorganismen, Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation N-heterocyclischer aromatischer Verbindungen und insbesondere Verfahren zur Herstellung von Indigo und Indirubin.

DE 199 55 605 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Cytochrom P450-Monooxygenasen, welche zur Oxidation N-heterocyclischer aromatischer Verbindungen befähigt sind, dafür kodierende Nukleotidsequenzen, diese Sequenzen enthaltende Expressionskonstrukte und Vektoren, damit transformierte Mikroorganismen, Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation N-heterocyclischer aromatischer Verbindungen und insbesondere Verfahren zur Herstellung von Indigo und Indirubin.

Enzyme mit neuartigen Funktionen und Eigenschaften können entweder durch Screening natürlicher Proben oder durch Protein Engineering bekannter Enzyme bereitgestellt werden. Die letztgenannte Methode kann unter Umständen die geeignetere sein, um Eigenschaften zu induzieren, deren Generierung auf dem Wege natürlicher Selektion unwahrscheinlich ist. Trotz zahlreicher Anstrengungen zum Engineering von Enzymen gibt es bisher nur wenige erfolgreiche Studien zur Förderung der katalytischen Aktivität von Enzymmutanten bezüglich eines bestimmten Substrates (1-10). In diesen bekannten Fällen sind die Substrate strukturell eng verwandt mit dem nativen Substrat des jeweiligen Enzyms. Bisher gibt es keine Berichte über ein erfolgreiches Engineering von Enzymen, welche nach der Modifikation die Umsetzung einer Verbindung katalysieren, welche strukturell völlig verschieden vom nativen Substrat des Enzyms ist.

Die aus dem Bakterium *Bacillus megaterium* isolierbare Cytochrom P450-Monooxygenase katalysiert gewöhnlich die subterminale Hydroxylierung langkettiger, gesättigter Säuren und der entsprechenden Amide und Alkohole davon oder die Epoxydation ungesättigter langkettiger Fettsäuren oder gesättigter Fettsäuren mit mittlerer Kettenlänge (11-13). Die optimale Kettenlänge gesättigter Fettsäuren beträgt 14 bis 16 Kohlenstoffatome. Fettsäuren mit einer Kettenlänge von weniger als 12 werden nicht hydroxyliert (11).

Die Struktur der Häm-Domäne von P450 BM-3 wurde durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt (14-16). Die Substratbindungsstelle liegt in Form einer langen tunnelartigen Öffnung vor, welche von der Moleküloberfläche bis hin zum Häm-Molekül reicht und wird fast ausschließlich von hydrophoben Aminosäureresten begrenzt. Die einzigen geladenen Reste an der Oberfläche der Häm-Domäne sind die Reste Arg47 und Tyr51. Man nimmt an, daß diese an der Bindung der Carboxylatgruppe des Substrates durch Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt sind (14). Die Mutation von Arg47 zu Glu bewirkt eine Inaktivierung des Enzyms für Arachidonsäure (13), erhöht jedoch dessen Aktivität gegenüber C₁₂-C₁₄-Alkyltrimethylammonium-Verbindungen (17). Eine Substratnutzung für aromatische Verbindungen, insbesondere zwei- oder mehrkernige N-heterocyclische Aromaten, wurde für dieses Enzym nicht beschrieben. Es wurde deshalb bisher in der Fachwelt angenommen, daß Indol aufgrund der deutlichen strukturellen Unterschiede zu den nativen Substraten von P450 BM-3, insbesondere aufgrund des Fehlens funktioneller Gruppen, welche an die oben erwähnten Reste in der Substrattasche binden könnten, kein Substrat darstellen.

Es ist deshalb Aufgabe der vorliegenden Erfindung neue Cytochrom P450 Monooxygenasen mit veränderter Substratspezifität bereit zu stellen. Insbesondere sollten Monooxygenase-Mutanten bereitgestellt werden, welche im Vergleich zu dem nichtmutierten Enzym mit strukturell deutlich anderen Substraten enzymatisch aktiv sind.

Diese Aufgabe konnte überraschenderweise gelöst werden durch Cytochrom P450 Monooxygenasen, welche zur Oxidation N-heterocyclischer zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen befähigt ist.

Insbesondere sind Gegenstand der Erfindung solche Monooxygenasen, deren Substratbindender Bereich durch ortsspezifische Mutagenese zur funktionalen Aufnahme des N-heterocyclischen Substrats befähigt ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die neuen Monooxygenase löslich, d. h. in nicht-membrangebundener Form existent, und in dieser Form enzymatisch aktiv.

Die erfindungsgemäßen Monooxygenasen sind vorzugsweise abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenasen bakteriellen Ursprungs, wie insbesondere abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenase BM-3 aus *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2, welche wenigstens eine funktionelle, d. h. die Oxidation N-heterocyclischer zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen fördernde Mutation, in einem der Aminosäuresequenzbereiche 172-224 (F/G-loop-Bereich), 39-43 (β -strand 1), 48-52 (β -strand 2), 67-70 (β -strand 3), 330-335 (β -strand 5), 352-356 (β -strand 8), 73-82 (helix 5) und 86-88 (helix 6) aufweist.

Besonders bevorzugten Monooxygenase-Mutanten dieses Typs sind, dadurch gekennzeichnet, daß sie wenigstens eine der folgenden ein- oder mehrfachen Aminosäuresubstitutionen aufweist:

- a) Phe87Val;
- b) Phe87Val, Leu188Gln; oder
- c) Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly;

sowie funktionale Äquivalente davon. Funktionale Analoga sind in diesem Zusammenhang davon verschiedene Mutanten, welche weiterhin die gewünschte Substratspezifität gegenüber heterozyklischen Aromaten besitzen und insbesondere Indol hydroxylieren.

Erfindungsgemäß oxidierbare, insbesondere hydroxylierbare N-heterocyclische zwei- oder mehrkernige aromatische Verbindungen umfassen vorzugsweise zwei oder drei, insbesondere zwei, vier- bis siebengliedrigen, insbesondere sechs- oder fünfgliedrige, kondensierte Ringe, wobei wenigstens einer, vorzugsweise alle Ringe aromatischen Charakter besitzen und wobei wenigstens einer der Ringe ein bis drei, vorzugsweise ein N-Heteroatom trägt. In der Ringstruktur können gegebenenfalls ein oder zwei weitere Heteroatome, wie O und S, enthalten sein. Die aromatischen Verbindungen können weiterhin 1 bis 5 Substituenten an den Ring-Kohlenstoff- oder an den Heteroatomen tragen. Beispiele für geeignete Substituenten sind Methyl, Hydroxyl und Halogen, wie F, Cl, und Br. Nichtlimitierende Beispiele für geeignete Substrate sind Indol, N-Methyl-indol und die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon.

Gegenstand der Erfindung sind auch Nukleinsäuresequenzen, kodierend für eine der obigen Monooxygenasen. Bevorzugte Nukleinsäuresequenzen sind abgeleitet von SEQ ID NO: 1, welche wenigstens eine Nukleotidsubstitution aufweist, die zu einer der oben beschriebenen funktionellen Aminosäuremutationen führt. Außerdem sind die davon abgeleiteten, an die Kodonnutzung verschiedener Wirtsorganismen angepaßten Sequenzen Gegenstand der Erfindung. Gegenstand der Erfindung sind außerdem durch Addition, Substitution, Insertion oder Deletion einzelner oder mehrerer Nu-

kleotide erhaltenen funktionalen Analoga der Nukleinsäuren, welche weiterhin für eine Monooxygenase mit der gewünschten Substratspezifität, insbesondere mit Indol-oxidierender Aktivität, kodieren.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem Expressionskonstrukte, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen, wie einem 5'-stromaufwärts gelegenen konstitutiven oder nicht-konstitutiven Promotor und 3'-stromabwärts gelegenen Terminator, eine kodierende Sequenz, welche eine Nukleinsäuresequenz gemäß obiger Definition umfasst. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z. B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der P_PP₁-Promotor. Weitere regulative Elemente umfassen Enhancer, selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge, Polyadenylierungssignale und dergleichen.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem Vektoren, wie z. B. Viren und Plasmide, umfassend wenigstens eines der erfindungsgemäßen Expressionskonstrukte. Gegenstand der Erfindung sind weiterhin rekombinante Mikroorganismen, transformiert mit wenigstens einem solchen Vektor. Bevorzugte Mikroorganismen sind ausgewählt unter Bakterien der Gattung *Escherichia*, wie z. B. *E. coli*.

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation N-heterocyclischer zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen gemäß obiger Definition, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- a1) einen rekombinanten Mikroorganismus gemäß obiger Definition in einem Kulturmedium, gegebenenfalls in Gegenwart eines Substrats, kultiviert; oder
- a2) ein Substrat-haltiges Reaktionsmedium mit einem erfindungsgemäßen Enzym inkubiert; und
- b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.

Eine bevorzugte Verfahrensvariante ist auf die Bildung von Indol/Indirubin gerichtet und dadurch gekennzeichnet, daß man aus dem Medium das gebildete Indol und/oder Indirubin isoliert.

Wird die Umsetzung mit einem rekombinanten Mikroorganismus durchgeführt, so erfolgt vorzugsweise zunächst die Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff und in einem Komplexmedium, wie z. B. TB- oder LB-Medium bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 30 bis 40°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 kultiviert, bis eine ausreichende Zelldichte erreicht ist. Die Zugabe von Indol ist gewöhnlich nicht erforderlich, da dieses vom Mikroorganismus intermediär gebildet wird. Um die Oxidationsreaktion besser steuern zu können, bevorzugt man die Verwendung eines induzierbaren, insbesondere temperaturinduzierbaren, Promotors. Man erhöht dabei die Temperatur auf die erforderliche Induktionstemperatur, z. B. 42°C beim P_PP₁-Promotor, behält dies über einen ausreichenden Zeitraum, z. B. 1 bis 10 oder 5 bis 6 Stunden, zur Expression der Monooxygenase-Aktivität bei und verringert anschließend der Temperatur wieder einen Wert von etwa 30 bis 40°C. Die Kultivierung wird dann in Gegenwart von Sauerstoff 12 Stunden bis 3 Tage fortgesetzt. Der pH-Wert kann dabei durch Zugabe von NaOH, z. B. auf 9 bis 10, erhöht werden, wodurch die Indigobildung bzw. Indirubinbildung durch Luftoxidation der enzymatisch gebildeten Oxidationsprodukte 2- und 3-Hydroxyindol zusätzlich gefördert wird.

Wird die Umsetzung dagegen mit gereinigtem oder angereichertem Enzym durchgeführt so löst man das erfindungsgemäße Enzym in einem Indol-haltigen Medium (etwa 0,01 bis 10 mM, oder 0,05 bis 5 mM), und führt die Umsetzung bei einer Temperatur von etwa 10 bis 50°C, wie z. B. 30 bis 40°C, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 (wie z. B. eingestellt mit 100 bis 200 mM Phosphat- oder Tris-Puffer), sowie in Gegenwart eines Reduktionsmittels durch, wobei das Indol-haltige Medium außerdem bezogen auf Indol einen etwa 10- bis 100fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten enthält. Bevorzugtes Reduktionsmittel ist NADPH.

Das gebildete Oxidationsprodukt kann dann in herkömmlicher Weise, wie z. B. durch Extraktion oder Chromatographie, vom Medium abgetrennt und gereinigt werden.

Weitere Gegenstände der Erfindung betreffen Bioreaktoren, umfassend ein erfindungsgemäßes Enzym oder einen erfindungsgemäßen rekombinanten Mikroorganismus in immobilisierter Form.

Ein letzter Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Cytochrom P450 Monooxygenase oder eines erfindungsgemäßen Vektors oder Mikroorganismus zur mikrobiologischen Oxidation N-heterocyclischer zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen, insbesondere im Rahmen der Bildung von Indigo und/oder Indirubin.

Die vorliegende Erfindung wird nunmehr unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele näher beschrieben.

Beispiel 1

Randomisierung spezieller Codons von P450 BM-3

Die Versuche wurden im wesentlichen wie beschrieben in (19) durchgeführt. Drei Positionen (Phe87, Leu188 und Ala74) wurden mit Hilfe von ortsspezifischer Mutagenese unter Verwendung des Stratagene QuikChange kit (La Jolla, CA, USA) randomisiert. Folgende PCR-Primer wurden für die einzelnen Positionen verwendet: Phe87: 5'-gcaggagcgggtgtnnnacaagctggacg-3' (SEQ ID NO: 3), 5'-cgtccagctgtgtnnncaaccgctcctgc-3' (SEQ ID NO: 4) Leu188: 5'-gaagcaatgaacaagnnncagcgagcaaatccag-3' (SEQ ID NO: 5), 5'-ctggattgtcgtcgtgtnnnctgttcattgcttc-3' (SEQ ID NO: 6); Ala74: 5'-gctttgataaaaactaaagtcaannncttaattgtacg-3' (SEQ ID NO: 7), 5'-cgtacaaattgaagnnnttgacttaagttttatcaaagc-3' (SEQ ID NO: 6).

Die Bedingungen für die PCR waren für alle drei Positionen identisch. Insbesondere wurden je 50 µl Reaktionsvolumen 17,5 pmol eines jeden Primers, 20 pmol Template-Plasmid-DNA, 3 U der Pfu Polymerase und 3,25 nmol von jedem dNTP verwendet. Die PCR Reaktion wurde bei 94°C/1 min gestartet und dann wurde folgender Temperaturzyklus 20 mal durchgeführt: 94°C, 1 min. 46°C, 2,5 min. 72°C, 17 min. Nach 20 Zyklen wurde die Reaktion 15 min bei 72°C fortgesetzt. Nach der PCR wurde die Template DNA mit 20 U DpnI bei 37°C 3 h verdaut. Anschließend wurde *E. coli* DH5α transformiert. Die transformierten *E. coli* DH5α-Zellen wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert, welche 150 µg/ml Ampicillin enthielten. Anschließend wurde 18 h bei 37°C inkubiert.

Beispiel 2

Expression und Reinigung der P450 BM-3 und dessen Mutanten und Produktion eines blauen Pigmentes

5 Das P450 BM-3-Gen und die Mutanten davon wurden unter der Kontrolle des starken, Temperatur-induzierbaren P_{RPL} -Promotors des Plasmids pCYTEXP1 in E. coli DH5 α wie bereits beschrieben (20), exprimiert. Kolonien wurden mit sterilen Zahnstochern aufgenommen und in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen, enthaltend je Vertiefung 200 μ l TB-Medium und 100 μ g/ml Ampicillin transferiert. Anschließend wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. 40 μ l der Zellkultur einer jeden Vertiefung wurden anschließend in ein Kulturröhrchen überführt, das 2 ml TB-Medium mit 100 μ g/ml
 10 Ampicillin enthält. Anschließend wurde 2 h bei 37°C kultiviert. Dann wurde die Temperatur zur Induktion 6 h auf 42°C erhöht. Dann wurde die Kultivierung über Nacht bei 37°C fortgesetzt, wobei ein blaues Pigment produziert wurde.

Die präparative Herstellung von Enzym oder blauem Pigment wurde ausgehend von einer 300 ml Zellkultur ($OD_{578 \text{ nm}} = 0,8$ bis 1,0) durchgeführt. Zur Isolierung des Enzymes wurden die Zellen 10 min bei 4000 Upm abzentrifugiert, in 0,1 M K_2PO_4 -Puffer, pH 7,4 resuspendiert. Die eiskühlten Zellen wurden mit Hilfe eines Branson Sonifiers W25
 15 (Dietzenbach, Deutschland) bei einer Energieoutput von 80 W durch dreimalige Beschallung von 2 min vorsichtig aufgeschlossen. Die Suspensionen wurden 20 min bei $32\,570 \times g$ zentrifugiert. Der Rohextrakt wurde zur Aktivitätsbestimmung bzw. zur Enzymreinigung eingesetzt. Die Enzymreinigung erfolgte wie in (21) bereits beschrieben, worauf hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird. Die Konzentration an gereinigtem Enzym wurde über die Extinktionsdifferenz bei 450 und 490 nm, wie in (11) bereits beschrieben, unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten ϵ von $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt.
 20

Beispiel 3

Isolierung von Mutanten, welche große Mengen an blauem Pigment produzieren

25 Jeweils 100 Kolonien wurden von den Mutanten einer jeden Position isoliert, welche durch randomisierte Mutagenese des Codons der entsprechenden Position erzeugt wurden. Diese Kolonien wurden in Kulturröhrchen zur Produktion von blauem Pigment kultiviert. Nach dem Waschen der Zellen mit Wasser und mehreren langsamen Zentrifugationsschritten (500 Upm) wurde das blaue Pigment mit Dimethylsulfoxid (DMSO) extrahiert. Die Löslichkeit des blauen Pigmentes war in DMSO am größten. Die Absorption des Extraktes wurde bei 677 nm bestimmt. Diejenige Mutante, welche die
 30 größte Menge an blauem Pigment von allen Mutanten einer bestimmten Position produzierte, wurde für eine DNA-Sequenzierung (ABI DNA Sequenzierungs-Kit; ABI Prisma™ 377 DNA Sequencer) verwendet und außerdem als Template für ortsspezifische randomisierte Mutagenese verwendet.

35 Beispiel 4

Aktivitätstest für die Indol-Hydroxylierung

Die Indol-Hydroxylierungsaktivität wurde in einer Lösung getestet, die 8 μ l einer 10–500 mM Indollösung in DMSO, 850 μ l Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 8,2) und 0,6 nmol P450 BM-3 Wildtyp oder Mutante in einem Endvolumen von 1 ml
 40 enthält. Das Gemisch wurde 9 min vorinkubiert, bevor man die Reaktion durch Zugabe von 50 μ l einer wässrigen 1 mM Lösung von NADPH startete. Die Reaktion wurde nach 20 sec durch Zugabe von 60 μ l 1,2 M KOH gestoppt. Innerhalb von 5 bis 30 sec (unter aeroben Bedingungen) wurden die Enzymprodukte vollständig in Indigo ($[\Delta^{2,2'}\text{-Biindolin}]\text{-3,3'-dion}$) und Indirubin ($[\Delta^{2,3'}\text{-Biindolin}]\text{-2,3-dion}$) überführt. Die Indigoproduktion wurde über dessen Absorption bei
 45 670 nm bestimmt. Eine Eichkurve mit reinem Indigo zeigte einen Extinktionskoeffizienten von $3,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei dieser Wellenlänge. Ein linearer Kurvenverlauf wurde für die Indigoproduktion in einer Reaktionszeit von 40 sec unter Verwendung von 0,6 nmol Wildtyp bzw. P450 BM-3-Mutante und 0,05 bis 5,0 mM Indol erhalten. Indirubin zeigt eine sehr schwache Absorption bei 670 nm und die gebildete Indirubinmenge war sehr viel geringer als die gebildete Indigomenge. Die Bildung von Indirubin wurde bei der Bestimmung der kinetischen Parameter vernachlässigt. Der NADPH-
 50 Verbrauch wurde bei 340 nm bestimmt und unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten von $6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ wie beschrieben (17) berechnet.

Beispiel 5

55 Reinigung von Indigo und Indirubin

Nach Waschen der Zellen mit Wasser und wiederholter Zentrifugation bei 500 g wurde das gebildete blaue Pellet mit Tetrahydrofuran (THF) extrahiert. Der Extrakt wurde bis fast zur Trockene eingedampft und das rote Pigment wurde mehrmals mit 50 ml absolutem Ethanol extrahiert. Der verbleibende blaue Feststoff wurde in THF gelöst und durch
 60 Dünnschichtchromatographie (TLC) analysiert. Die Ethanollösung wurde eingedampft und durch Silicagelchromatographie (DC 60, Merck, Darmstadt, Deutschland; 2 cm \times 30 cm) gereinigt, bevor sie mit THF und Petrolether in einem Verhältnis von 1 : 2 gewaschen wurde. Die erhaltene rote Lösung wurde eingedampft und deren Reinheit wurde durch TLC bestimmt. Die Absorptionsspektren des blauen und des roten Pigmentes wurden mit Hilfe eines Ultraspec 3000 Spektrophotometers (Pharmacia, Uppsala, Sweden) in einem Bereich von 400 bis 800 nm bestimmt. Außerdem wurde der blaue
 65 und der rote Farbstoff durch Massenspektrometrie und $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie analysiert.

1. Erhöhung der Produktivität für blaues Pigment durch P450 BM-3-Mutagenese

Natives P450 BM-3 besitzt nicht die Fähigkeit zur Produktion des blauen Indigo-enthaltenden Pigments, bzw. der Vorläufersubstanzen 2- bzw 3-Hydroxyindol. Um eine ausreichende Menge an blauem Pigment herstellen zu können, wurde P450 BM3 einer gezielten Evolution ausgesetzt. Sämtliche Mutanten, welche das blaue Pigment produzierten, wurden sequenziert. Es wurde festgestellt, daß wenigstens eine der folgenden drei Positionen mutiert waren: Phe87, Leu188 und Ala74. Es wurde deshalb angenommen, daß diese drei Positionen eine entscheidende Rolle für die Aktivität von P450 BM-3 bei der Produktion von blauem Pigment spielen. Aus der Struktur der Häm-Domäne von Cytochrom-P450-BM-3, komplexiert mit Palmitoleinsäure sieht man, daß Phe87 das Substrat an einem näheren Heranrücken an die Häm-Gruppe hindert (14). Die Mutante Phe87Val zeigt eine hohe Regio- und Stereoselektivität bei der Epoxidation von (14S, 15R)-Arachidonsäure (13) und die Mutante Phe87Ala verschiebt die Hydroxylierungsposition von ω -1, ω -2 und ω -3 zu ω (22). Die Position 87 wurde deshalb als erste für die ortsspezifische randomisierte Mutagenese mit Hilfe von PCR ausgewählt. In Röhrenkulturen wurden 7 Kolonien erhalten, welche eine geringe Menge an blauem Pigment nach Induktion produzierten. Die Kolonie, welche die größte Menge des blauen Pigments produzierte, wurde für die DNA-Sequenzierung ausgewählt. Die Sequenzdaten ergaben eine Substitution von Phe87 durch Val. Die Mutante Phe87Val wurde anschließend als Template für die zweite Runde der ortsspezifischen randomisierte Mutagenese an Position Leu188 verwendet. Die Struktur der Häm-Domäne, komplexiert mit Palmitoleinsäure zeigt, daß die Repositionierung der F- und G-Helices den Rest Leu188 in direkten Kontakt mit dem Substrat bringt (14). Diese Position könnte deshalb eine wichtige Rolle bei der Substratbindung oder -orientierung spielen. Nach dem zweiten Screeningdurchgang wurden 31 Kolonien beobachtet, welche das blaue Pigment produzierten. Die Mutante, welche die größte Pigmentmenge produzierte, enthielt die Substitutionen Phe87Val und Leu188Gln. Diese Mutante wurde anschließend in Position Ala74 im dritten Durchgang der ortsspezifischen randomisierten Mutagenese mutiert. Man erhielt dabei die Dreifachmutante F87L188A74 (Phe887Val, Leu188Gln und Ala76Gly), welche mehrere mg blaues Pigment in einem 2-Liter-Kolben, enthaltend 300 ml TB-Medium, produzierte. Diese Menge reichte zur Isolierung und Charakterisierung des blauen Pigmentes aus.

2. Isolierung und Identifizierung des blauen Pigments

Nach dem Auswaschen der Zellen wurde das verbleibende blaue Pellet mit THF extrahiert und TLC analysiert. Das blaue Pigment wurde in eine schneller wandernde blaue Komponente und in eine langsamer wandernde rote Komponente aufgetrennt. Beide Komponenten zeigten exakt die gleichen Mobilitätsparameter wie die Komponenten einer kommerziellen Indigo-Probe.

Nach der Reinigung wurden die Absorptionsspektren beider Komponenten in DMSO bestimmt. Die blaue Komponente zeigte das gleiche Spektrum wie eine kommerzielle Indigoprobe. Die gereinigte blaue und rote Komponente wurden jeweils durch Massenspektrometrie analysiert. Die Massenspektren beider Pigmente zeigten einen starken Molekülionenpeak bei $m/z = 262$ und zwei Fragmentationenpeaks bei $m/z = 234$ und 205 (relative Intensität jeweils 10%). Dieses Muster ist typisch für indigoide Verbindungen. Die Elementarzusammensetzung dieser Ionen wurde durch hochauflösende Massenspektrometrie bestimmt als $C_{16}H_{10}N_2O_2$, $C_{15}H_{10}N_2O$ bzw. $C_{14}H_9N_2$. Dies ist ebenfalls charakteristisch für Strukturen vom Indigotyp. Das blaue Pigment wurde somit als Indigo und das rote Pigment als Indirubin bestimmt. Zur Bestätigung der Struktur wurden 500 MHz 1H -NMR-Spektren beider Pigmente in DMSO- D_6 -Lösung durchgeführt. Die Ergebnisse stimmten mit den Literaturangaben (23) überein.

3. Produktion von Indigo mit isolierten Enzymen

Es ist bekannt, daß Indigo aus Indol durch mikrobielle Transformation zugänglich ist (24–26). Keines dieser mikrobiellen Systeme enthielt jedoch eine P450 Monooxygenase. Erfindungsgemäß wurde zunächst die katalytische Aktivität des reinen Enzyms für Indol bestimmt. Die Mutante F87L188A74 wurde mit Indol vermischt. Keine Farbreaktion war zu beobachten. Erst nach Zugabe von NADPH zum Reaktionsgemisch bildete sich das blaue Pigment nach etwa 20 min. Durch Einstellung des pH-Werts der Reaktionsmischung auf einen Wert von etwa 11, 30 sec nach Zugabe von NADPH, wurde die blaue Färbung innerhalb von wenigen Sekunden sichtbar. Kontrollversuche unter Verwendung von nativem P450 BM-3 waren immer negativ, selbst unter Verwendung erhöhter Konzentrationen an Enzym, Indol und NADPH. Das blaue Pigment wurde mit Ethylacetat extrahiert und durch TLC analysiert. Das blaue Pigment trennte sich wieder in eine schneller laufende blaue Komponente und in eine langsamer laufende rote Komponente auf. Die R_f -Werte und die Absorptionsspektren waren identisch mit denjenigen Werten der Extrakte aus der Fermentationsbrühe. Die F87L188A74-Mutante von P450 BM-3 stellt somit eine Indolhydroxylase dar.

Es sind bisher zwei Wege für die enzymatische Transformation von Indol zu Indigo beschrieben worden. Ein Weg wird durch eine Dioxygenase, der andere durch eine Styrolmonooxygenase katalysiert (24, 25). Die NADPH-Stöchiometrie beträgt in beiden Fällen 2. Es wurde deshalb angenommen, daß im Gegensatz zu den Dioxygenasen die erfindungsgemäße Mutante F87L188A74 Indol in nur einer Position hydroxyliert, um Oxindol (2-Hydroxyindol) oder Indoxyl (3-Hydroxyindol) zu bilden.

4. Kinetische Parameter der Indolhydroxylierung

Reine Proben des Wildtyp-Enzyms P450 BM-3 und der Mutanten Leu188Gln, Phe87Val, F87L188 und F87L188A74 wurden zur Bestimmung der kinetischen Parameter der Indolhydroxylierung verwendet. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

Kinetische Parameter der P450 BM-3 Mutanten für Indolhydroxylierung

5	Mutanten	K_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	K_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
10	WT	a)	-	-
	Leu188Gln	n.d. b)	n.d.	n.d.
	Phe87Val	2,03 (0,14)	17,0 (1,0)	119
15	F87L188	2,28 (0,16)	4,2 (0,4)	543
	F87L188A74	2,73 (0,16)	2,0 (0,2)	1365

20 a) keine Aktivität wurde beobachtet;

b) nicht bestimmt (Aktivität war zu gering um gemessen zu werden

25 Selbst beim Überschuß an gereinigtem Enzym und hoher Indolkonzentration ist das Wildtyp-Enzym nicht in der Lage, Indol zu oxidieren. Die Mutante Leu188Gln zeigt eine geringe Aktivität. Die Mutante Phe87Val zeigt eine katalytische Wirksamkeit von $119 M^{-1}s^{-1}$ für die Indolhydroxylierung. Die katalytische Effizienz der Doppelmutante F87L188 (Phe87Val, Leu188Gln) erhöhte sich auf $543 M^{-1}s^{-1}$ und wurde durch Einführung der weiteren Substitution Ala74Gly auf $1365 M^{-1}s^{-1}$ erhöht. Die K_{cat} -Werte erhöhten sich von Phe87Val zur Dreifachmutante hin um insgesamt 35%, während die K_m -Werte etwa um das Siebenfache abnahmen. Dies weist darauf hin, daß Ala74Gly und Leu188Gln vorwiegend an der Substatbindung beteiligt sind.

30 Die Indol-Turnover-Rate ($K_{cat} = 2,73 s^{-1}$) war für die Dreifachmutante F87L188A74 mehr als zehnfach höher als für die meisten P450-Enzyme (18).

35 LITERATUR

1. Yano, T., Oue, S., and Kagamiyama, H. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5511-5515.
2. Zhang, J.-H., Dawes, G., and Stemmer, W. P. C. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4504-4509.
- 40 3. Wan, L., Twitchett, M. B., Eltis, L. D., Mauk, A. G., and Smith, M. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 12825-12831.
4. Cronin, C. N. (1998) J. Biol. Chem 273, 24465-24469.
5. Wilks, H. M., Hart, K. W., Feeney, R., Dunn, C. R., Muirhead, H., Chia, W. N., Barstow, D. A., Atkinson, T., Clarke, A. R., Holbrook, I. J. (1988) Science 242, 1541-1544.
- 45 6. Hedstrom, L., Szilagyi, L., Rutter, W. J. (1992) Science 255, 1249-1253.
7. Tucker, C. L., Hurley, J. H., Miller, T. R., and Hurley, I. B. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5993-5997.
8. Quemeneur, E., Moutiez, J.-B. C., and Menez, A. (1998) Nature (London) 391, 301-303.
9. Marsden, A. F. A., Wilkinson, B., Cortes, J., Dunster, N. J., Staunton, I., Leadlay, P. F. (1998) Science 279, 199-201.
10. Chen, R., Greer, A., and Dean, A. M. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 11666-11670.
- 50 11. Boddupalli, S. S., Estabrook, R. W., and Peterson, J. A. (1990) J. Biol. Chem 265, 4233-4239.
12. Capdevila, J. H., Wie, S., Helvig, C., Falck, J. R., Belosludtsev, Y., Truan, G., Graham-Lorence, S. E., and Peterson, J. A. (1996) J. Biol. Chem 271, 22663-22671.
13. Graham-Lorence, S., Truan, G., Peterson, J. A., Flack, J. R., WeL S., Helvig, C., Capdevilla, J. H. (1997) J. Biol. Chem 272, 1127-1135.
- 55 14. Li, H., Poulos, T. L. (1997) Nat. Structural Biol., 4, 140-146.
15. Ravichandran, K. G., Sekhar, S., Boddupalli, S., Hasemann, C. A., Peterson, J. A., Deisenhofer, 1 (1993) Science 261, 731-736.
16. Modi S., Sutcliffe, M. J., Primrose, W. U., Lian, L.-Y., Roberts, G. C. K (1996) Nat. Structural Biol. 3, 414-417.
17. Oliver, C. F., ModL S., Primrose, W. U., Lian, L. Y. and Roberts, G. C. K (1997) Biochem. J 327, 537-544.
- 60 18. Guengerich, F. G. (1991) J. Biol. Chem 266, 10019-10022.
19. Cherry, J. R., Lamsa, M. H., Schneider, P., Vind, J., Svendsen, A., Jones, A., and Pedersen, A. H. (1999) Nature Biotechnology 17, 379-384.
20. Schwaneberg, U., Schmidt-Dannert, C., Schmitt, J., and Schmid, R. D. (1999) Anal Biochem. 269, 359-366.
21. Schwaneberg, U., Sprauer, AL, Schmidt-Dannert, C., and Schmid, R. D. J of Chromatogr. A, in press.
- 65 22. Oliver, C. F., Modi, S., Sutcliffe, M. J., Primrose, W. U., Lian, L. Y. and Roberts, G. C. K (1997) Biochemistry 36, 1567-1572.
23. Hart, S., Koch, KR., and Woods, D. R. (1992) J Gen. Microbiol. 138, 211-216.
24. Murdock, D., Ensley, B. D., Serdar, C. and Thalen, M. (1993) Bio/Technology 11, 381-385.

DE 199 55 605 A 1

25. O'Connor, ICE., Dobson, A-W. and Hartmans, S. (1997) Appl. Environ. Microbiol. 63, 4287-4291.
26. Eaton, R. W. and Chapman, P. J. (1995) J Bacteriol. 177, 6983-6988.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 199 55 605 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

5 <120> Indigo-produzierende Cytochrom P450 Monooxygenasen

<130> M/40241

<140>

10 <141>

<160> 9

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3150

<212> DNA

20 <213> Bacillus megaterium

<220>

<221> CDS

<222> (4)..(3150)

25 <400> 1

atg aca att aaa gaa atg cct cag cca aaa acg ttt gga gag ctt aaa 48
 Thr Ile Lys Glu Met Pro Gln Pro Lys Thr Phe Gly Glu Leu Lys
 1 5 10 15

30 aat tta ccg tta tta aac aca gat aaa ccg gtt caa gct ttg atg aaa 96
 Asn Leu Pro Leu Leu Asn Thr Asp Lys Pro Val Gln Ala Leu Met Lys
 20 25 30

35 att gcg gat gaa tta gga gaa atc ttt aaa ttc gag gcg cct ggt cgt 144
 Ile Ala Asp Glu Leu Gly Glu Ile Phe Lys Phe Glu Ala Pro Gly Arg
 35 40 45

40 gta acg cgc tac tta tca agt cag cgt cta att aaa gaa gca tgc gat 192
 Val Thr Arg Tyr Leu Ser Ser Gln Arg Leu Ile Lys Glu Ala Cys Asp
 50 55 60

45 gaa tca cgc ttt gat aaa aac tta agt caa gcg ctt aaa ttt gta cgt 240
 Glu Ser Arg Phe Asp Lys Asn Leu Ser Gln Ala Leu Lys Phe Val Arg
 65 70 75

50 gat ttt gca gga gac ggg tta ttt aca agc tgg acg cat gaa aaa aat 288
 Asp Phe Ala Gly Asp Gly Leu Phe Thr Ser Trp Thr His Glu Lys Asn
 80 85 90 95

55 tgg aaa aaa gcg cat aat atc tta ctt cca agc ttc agt cag cag gca 336
 Trp Lys Lys Ala His Asn Ile Leu Leu Pro Ser Phe Ser Gln Gln Ala
 100 105 110

atg aaa ggc tat cat gcg atg atg gtc gat atc gcc gtg cag ctt gtt 384
 Met Lys Gly Tyr His Ala Met Met Val Asp Ile Ala Val Gln Leu Val
 115 120 125

60 caa aag tgg gag cgt cta aat gca gat gag cat att gaa gta ccg gaa 432
 Gln Lys Trp Glu Arg Leu Asn Ala Asp Glu His Ile Glu Val Pro Glu
 130 135 140

65 gac atg aca cgt tta acg ctt gat aca att ggt ctt tgc ggc ttt aac 480
 Asp Met Thr Arg Leu Thr Leu Asp Thr Ile Gly Leu Cys Gly Phe Asn

DE 199 55 605 A 1

145	150	155		
tat cgc ttt aac agc ttt tac cga gat cag cct cat cca ttt att aca Tyr Arg Phe Asn Ser Phe Tyr Arg Asp Gln Pro His Pro Phe Ile Thr 160 165 170 175			528	5
agt atg gtc cgt gca ctg gat gaa gca atg aac aag ctg cag cga gca Ser Met Val Arg Ala Leu Asp Glu Ala Met Asn Lys Leu Gln Arg Ala 180 185 190			576	10
aat cca gac gac cca gct tat gat gaa aac aag cgc cag ttt caa gaa Asn Pro Asp Asp Pro Ala Tyr Asp Glu Asn Lys Arg Gln Phe Gln Glu 195 200 205			624	15
gat atc aag gtg atg aac gac cta gta gat aaa att att gca gat cgc Asp Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Val Asp Lys Ile Ile Ala Asp Arg 210 215 220			672	20
aaa gca agc ggt gaa caa agc gat gat tta tta acg cat atg cta aac Lys Ala Ser Gly Glu Gln Ser Asp Asp Leu Leu Thr His Met Leu Asn 225 230 235			720	25
gga aaa gat cca gaa acg ggt gag ccg ctt gat gac gag aac att cgc Gly Lys Asp Pro Glu Thr Gly Glu Pro Leu Asp Asp Glu Asn Ile Arg 240 245 250 255			768	30
tat caa att att aca ttc tta att gcg gga cac gaa aca aca agt ggt Tyr Gln Ile Ile Thr Phe Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Ser Gly 260 265 270			816	35
ctt tta tca ttt gcg ctg tat ttc tta gtg aaa aat cca cat gta tta Leu Leu Ser Phe Ala Leu Tyr Phe Leu Val Lys Asn Pro His Val Leu 275 280 285			864	40
caa aaa gca gca gaa gaa gca gca cga gtt cta gta gat cct gtt cca Gln Lys Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Val Leu Val Asp Pro Val Pro 290 295 300			912	45
agc tac aaa caa gtc aaa cag ctt aaa tat gtc ggc atg gtc tta aac Ser Tyr Lys Gln Val Lys Gln Leu Lys Tyr Val Gly Met Val Leu Asn 305 310 315			960	50
gaa gcg ctg cgc tta tgg cca act gct cct gcg ttt tcc cta tat gca Glu Ala Leu Arg Leu Trp Pro Thr Ala Pro Ala Phe Ser Leu Tyr Ala 320 325 330 335			1008	55
aaa gaa gat acg gtg ctt gga gga gaa tat cct tta gaa aaa ggc gac Lys Glu Asp Thr Val Leu Gly Gly Glu Tyr Pro Leu Glu Lys Gly Asp 340 345 350			1056	60
gaa cta atg gtt ctg att cct cag ctt cac cgt gat aaa aca att tgg Glu Leu Met Val Leu Ile Pro Gln Leu His Arg Asp Lys Thr Ile Trp 355 360 365			1104	65
gga gac gat gtg gaa gag ttc cgt cca gag cgt ttt gaa aat cca agt Gly Asp Asp Val Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Glu Asn Pro Ser 370 375 380			1152	
gcg att ccg cag cat gcg ttt aaa ccg ttt gga aac ggt cag cgt gcg Ala Ile Pro Gln His Ala Phe Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala 385 390 395			1200	
tgt atc ggt cag cag ttc gct ctt cat gaa gca acg ctg gta ctt ggt			1248	

DE 199 55 605 A 1

	Cys	Ile	Gly	Gln	Gln	Phe	Ala	Leu	His	Glu	Ala	Thr	Leu	Val	Leu	Gly	
	400					405					410					415	
5	atg	atg	cta	aaa	cac	ttt	gac	ttt	gaa	gat	cat	aca	aac	tac	gag	ctg	1296
	Met	Met	Leu	Lys	His	Phe	Asp	Phe	Glu	Asp	His	Thr	Asn	Tyr	Glu	Leu	
				420					425						430		
10	gat	att	aaa	gaa	act	tta	acg	tta	aaa	cct	gaa	ggc	ttt	gtg	gta	aaa	1344
	Asp	Ile	Lys	Glu	Thr	Leu	Thr	Leu	Lys	Pro	Glu	Gly	Phe	Val	Val	Lys	
				435					440					445			
15	gca	aaa	tcg	aaa	aaa	att	ccg	ctt	ggc	ggt	att	cct	tca	cct	agc	act	1392
	Ala	Lys	Ser	Lys	Lys	Ile	Pro	Leu	Gly	Gly	Ile	Pro	Ser	Pro	Ser	Thr	
			450					455					460				
20	gaa	cag	tct	gct	aaa	aaa	gta	cgc	aaa	aag	gca	gaa	aac	gct	cat	aat	1440
	Glu	Gln	Ser	Ala	Lys	Lys	Val	Arg	Lys	Lys	Ala	Glu	Asn	Ala	His	Asn	
		465					470					475					
25	acg	ccg	ctg	ctt	gtg	cta	tac	ggt	tca	aat	atg	gga	aca	gct	gaa	gga	1488
	Thr	Pro	Leu	Leu	Val	Leu	Tyr	Gly	Ser	Asn	Met	Gly	Thr	Ala	Glu	Gly	
	480				485					490					495		
30	acg	gcg	cgt	gat	tta	gca	gat	att	gca	atg	agc	aaa	gga	ttt	gca	ccg	1536
	Thr	Ala	Arg	Asp	Leu	Ala	Asp	Ile	Ala	Met	Ser	Lys	Gly	Phe	Ala	Pro	
				500					505					510			
35	cag	gtc	gca	acg	ctt	gat	tca	cac	gcc	gga	aat	ctt	ccg	cgc	gaa	gga	1584
	Gln	Val	Ala	Thr	Leu	Asp	Ser	His	Ala	Gly	Asn	Leu	Pro	Arg	Glu	Gly	
				515					520					525			
40	gct	gta	tta	att	gta	acg	gcg	tct	tat	aac	ggt	cat	ccg	cct	gat	aac	1632
	Ala	Val	Leu	Ile	Val	Thr	Ala	Ser	Tyr	Asn	Gly	His	Pro	Pro	Asp	Asn	
			530					535					540				
45	gca	aag	caa	ttt	gtc	gac	tgg	tta	gac	caa	gcg	tct	gct	gat	gaa	gta	1680
	Ala	Lys	Gln	Phe	Val	Asp	Trp	Leu	Asp	Gln	Ala	Ser	Ala	Asp	Glu	Val	
		545					550					555					
50	aaa	ggc	gtt	cgc	tac	tcc	gta	ttt	gga	tgc	ggc	gat	aaa	aac	tgg	gct	1728
	Lys	Gly	Val	Arg	Tyr	Ser	Val	Phe	Gly	Cys	Gly	Asp	Lys	Asn	Trp	Ala	
	560				565				570						575		
55	act	acg	tat	caa	aaa	gtg	cct	gct	ttt	atc	gat	gaa	acg	ctt	gcc	gct	1776
	Thr	Thr	Tyr	Gln	Lys	Val	Pro	Ala	Phe	Ile	Asp	Glu	Thr	Leu	Ala	Ala	
				580					585						590		
60	aaa	ggg	gca	gaa	aac	atc	gct	gac	cgc	ggt	gaa	gca	gat	gca	agc	gac	1824
	Lys	Gly	Ala	Glu	Asn	Ile	Ala	Asp	Arg	Gly	Glu	Ala	Asp	Ala	Ser	Asp	
			595					600					605				
65	gac	ttt	gaa	ggc	aca	tat	gaa	gaa	tgg	cgt	gaa	cat	atg	tgg	agt	gac	1872
	Asp	Phe	Glu	Gly	Thr	Tyr	Glu	Glu	Trp	Arg	Glu	His	Met	Trp	Ser	Asp	
			610					615					620				
70	gta	gca	gcc	tac	ttt	aac	ctc	gac	att	gaa	aac	agt	gaa	gat	aat	aaa	1920
	Val	Ala	Ala	Tyr	Phe	Asn	Leu	Asp	Ile	Glu	Asn	Ser	Glu	Asp	Asn	Lys	
		625					630					635					
75	tct	act	ctt	tca	ctt	caa	ttt	gtc	gac	agc	gcc	gcg	gat	atg	ccg	ctt	1968
	Ser	Thr	Leu	Ser	Leu	Gln	Phe	Val	Asp	Ser	Ala	Ala	Asp	Met	Pro	Leu	
	640					645					650				655		

DE 199 55 605 A 1

gcg aaa atg cac ggt gcg ttt tca acg aac gtc gta gca agc aaa gaa Ala Lys Met His Gly Ala Phe Ser Thr Asn Val Val Ala Ser Lys Glu 660 665 670	2016	
ctt caa cag cca ggc agt gca cga agc acg cga cat ctt gaa att gaa Leu Gln Gln Pro Gly Ser Ala Arg Ser Thr Arg His Leu Glu Ile Glu 675 680 685	2064	5
ctt cca aaa gaa gct tct tat caa gaa gga gat cat tta ggt gtt att Leu Pro Lys Glu Ala Ser Tyr Gln Glu Gly Asp His Leu Gly Val Ile 690 695 700	2112	10
cct cgc aac tat gaa gga ata gta aac cgt gta aca gca agg ttc ggc Pro Arg Asn Tyr Glu Gly Ile Val Asn Arg Val Thr Ala Arg Phe Gly 705 710 715	2160	15
cta gat gca tca cag caa atc cgt ctg gaa gca gaa gaa gaa aaa tta Leu Asp Ala Ser Gln Gln Ile Arg Leu Glu Ala Glu Glu Glu Lys Leu 720 725 730 735	2208	20
gct cat ttg cca ctc gct aaa aca gta tcc gta gaa gag ctt ctg caa Ala His Leu Pro Leu Ala Lys Thr Val Ser Val Glu Glu Leu Leu Gln 740 745 750	2256	25
tac gtg gag ctt caa gat cct gtt acg cgc acg cag ctt cgc gca atg Tyr Val Glu Leu Gln Asp Pro Val Thr Arg Thr Gln Leu Arg Ala Met 755 760 765	2304	30
gct gct aaa acg gtc tgc ccg ccg cat aaa gta gag ctt gaa gcc ttg Ala Ala Lys Thr Val Cys Pro Pro His Lys Val Glu Leu Glu Ala Leu 770 775 780	2352	
ctt gaa aag caa gcc tac aaa gaa caa gtg ctg gca aaa cgt tta aca Leu Glu Lys Gln Ala Tyr Lys Glu Gln Val Leu Ala Lys Arg Leu Thr 785 790 795	2400	35
atg ctt gaa ctg ctt gaa aaa tac ccg gcg tgt gaa atg aaa ttc agc Met Leu Glu Leu Leu Glu Lys Tyr Pro Ala Cys Glu Met Lys Phe Ser 800 805 810 815	2448	40
gaa ttt atc gcc ctt ctg cca agc ata cgc ccg cgc tat tac tcg att Glu Phe Ile Ala Leu Leu Pro Ser Ile Arg Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile 820 825 830	2496	45
tct tca tca cct cgt gtc gat gaa aaa caa gca agc atc acg gtc agc Ser Ser Ser Pro Arg Val Asp Glu Lys Gln Ala Ser Ile Thr Val Ser 835 840 845	2544	50
gtt gtc tca gga gaa gcg tgg agc gga tat gga gaa tat aaa gga att Val Val Ser Gly Glu Ala Trp Ser Gly Tyr Gly Glu Tyr Lys Gly Ile 850 855 860	2592	55
gcg tcg aac tat ctt gcc gag ctg caa gaa gga gat acg att acg tgc Ala Ser Asn Tyr Leu Ala Glu Leu Gln Glu Gly Asp Thr Ile Thr Cys 865 870 875	2640	60
ttt att tcc aca ccg cag tca gaa ttt acg ctg cca aaa gac cct gaa Phe Ile Ser Thr Pro Gln Ser Glu Phe Thr Leu Pro Lys Asp Pro Glu 880 885 890 895	2688	
acg ccg ctt atc atg gtc gga ccg gga aca ggc gtc gcg ccg ttt aga Thr Pro Leu Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg 900 905 910	2736	65

DE 199 55 605 A 1

ggc ttt gtg cag gcg cgc aaa cag cta aaa gaa caa gga cag tca ctt 2784
 Gly Phe Val Gln Ala Arg Lys Gln Leu Lys Glu Gln Gly Gln Ser Leu
 915 920 925

5. gga gaa gca cat tta tac ttc ggc tgc cgt tca cct cat gaa gac tat 2832
 Gly Glu Ala His Leu Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Pro His Glu Asp Tyr
 930 935 940

10 ctg tat caa gaa gag ctt gaa aac gcc caa agc gaa ggc atc att acg 2880
 Leu Tyr Gln Glu Glu Leu Glu Asn Ala Gln Ser Glu Gly Ile Ile Thr
 945 950 955

15 ctt cat acc gct ttt tct cgc atg cca aat cag ccg aaa aca tac gtt 2928
 Leu His Thr Ala Phe Ser Arg Met Pro Asn Gln Pro Lys Thr Tyr Val
 960 965 970 975

20 cag cac gta atg gaa caa gac ggc aag aaa ttg att gaa ctt ctt gat 2976
 Gln His Val Met Glu Gln Asp Gly Lys Lys Leu Ile Glu Leu Leu Asp
 980 985 990

25 caa gga gcg cac ttc tat att tgc gga gac gga agc caa atg gca cct 3024
 Gln Gly Ala His Phe Tyr Ile Cys Gly Asp Gly Ser Gln Met Ala Pro
 995 1000 1005

30 gcc gtt gaa gca acg ctt atg aaa agc tat gct gac gtt cac caa gtg 3072
 Ala Val Glu Ala Thr Leu Met Lys Ser Tyr Ala Asp Val His Gln Val
 1010 1015 1020

agt gaa gca gac gct cgc tta tgg ctg cag cag cta gaa gaa aaa ggc 3120
 Ser Glu Ala Asp Ala Arg Leu Trp Leu Gln Gln Leu Glu Glu Lys Gly
 1025 1030 1035

35 cga tac gca aaa gac gtg tgg gct ggg taa 3150
 Arg Tyr Ala Lys Asp Val Trp Ala Gly
 1040 1045

40 <210> 2
 <211> 1048
 <212> PRT
 <213> Bacillus megaterium

45 <400> 2
 Thr Ile Lys Glu Met Pro Gln Pro Lys Thr Phe Gly Glu Leu Lys Asn
 1 5 10 15

50 Leu Pro Leu Leu Asn Thr Asp Lys Pro Val Gln Ala Leu Met Lys Ile
 20 25 30

55 Ala Asp Glu Leu Gly Glu Ile Phe Lys Phe Glu Ala Pro Gly Arg Val
 35 40 45

Thr Arg Tyr Leu Ser Ser Gln Arg Leu Ile Lys Glu Ala Cys Asp Glu
 50 55 60

60 Ser Arg Phe Asp Lys Asn Leu Ser Gln Ala Leu Lys Phe Val Arg Asp
 65 70 75 80

65 Phe Ala Gly Asp Gly Leu Phe Thr Ser Trp Thr His Glu Lys Asn Trp
 85 90 95

Lys Lys Ala His Asn Ile Leu Leu Pro Ser Phe Ser Gln Gln Ala Met

DE 199 55 605 A 1

100	105	110	
Lys Gly Tyr His Ala Met Met Val Asp Ile Ala Val Gln Leu Val Gln			5
115	120	125	
Lys Trp Glu Arg Leu Asn Ala Asp Glu His Ile Glu Val Pro Glu Asp			
130	135	140	
Met Thr Arg Leu Thr Leu Asp Thr Ile Gly Leu Cys Gly Phe Asn Tyr			10
145	150	155	160
Arg Phe Asn Ser Phe Tyr Arg Asp Gln Pro His Pro Phe Ile Thr Ser			
	165	170	175
Met Val Arg Ala Leu Asp Glu Ala Met Asn Lys Leu Gln Arg Ala Asn			
	180	185	190
Pro Asp Asp Pro Ala Tyr Asp Glu Asn Lys Arg Gln Phe Gln Glu Asp			20
	195	200	205
Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Val Asp Lys Ile Ile Ala Asp Arg Lys			
	210	215	220
Ala Ser Gly Glu Gln Ser Asp Asp Leu Leu Thr His Met Leu Asn Gly			25
225	230	235	240
Lys Asp Pro Glu Thr Gly Glu Pro Leu Asp Asp Glu Asn Ile Arg Tyr			
	245	250	255
Gln Ile Ile Thr Phe Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Ser Gly Leu			
	260	265	270
Leu Ser Phe Ala Leu Tyr Phe Leu Val Lys Asn Pro His Val Leu Gln			35
	275	280	285
Lys Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Val Leu Val Asp Pro Val Pro Ser			
	290	295	300
Tyr Lys Gln Val Lys Gln Leu Lys Tyr Val Gly Met Val Leu Asn Glu			
305	310	315	320
Ala Leu Arg Leu Trp Pro Thr Ala Pro Ala Phe Ser Leu Tyr Ala Lys			45
	325	330	335
Glu Asp Thr Val Leu Gly Gly Glu Tyr Pro Leu Glu Lys Gly Asp Glu			
	340	345	350
Leu Met Val Leu Ile Pro Gln Leu His Arg Asp Lys Thr Ile Trp Gly			
	355	360	365
Asp Asp Val Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Glu Asn Pro Ser Ala			55
	370	375	380
Ile Pro Gln His Ala Phe Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala Cys			
385	390	395	400
Ile Gly Gln Gln Phe Ala Leu His Glu Ala Thr Leu Val Leu Gly Met			
	405	410	415
Met Leu Lys His Phe Asp Phe Glu Asp His Thr Asn Tyr Glu Leu Asp			65
	420	425	430
Ile Lys Glu Thr Leu Thr Leu Lys Pro Glu Gly Phe Val Val Lys Ala			

DE 199 55 605 A 1

	435	440	445
5	Lys Ser Lys Lys Ile Pro Leu Gly Gly Ile Pro Ser Pro Ser Thr Glu 450	455	460
	Gln Ser Ala Lys Lys Val Arg Lys Lys Ala Glu Asn Ala His Asn Thr 465	470	475 480
10	Pro Leu Leu Val Leu Tyr Gly Ser Asn Met Gly Thr Ala Glu Gly Thr 485	490	495
	Ala Arg Asp Leu Ala Asp Ile Ala Met Ser Lys Gly Phe Ala Pro Gln 500	505	510
15	Val Ala Thr Leu Asp Ser His Ala Gly Asn Leu Pro Arg Glu Gly Ala 515	520	525
20	Val Leu Ile Val Thr Ala Ser Tyr Asn Gly His Pro Pro Asp Asn Ala 530	535	540
	Lys Gln Phe Val Asp Trp Leu Asp Gln Ala Ser Ala Asp Glu Val Lys 545	550	555 560
25	Gly Val Arg Tyr Ser Val Phe Gly Cys Gly Asp Lys Asn Trp Ala Thr 565	570	575
30	Thr Tyr Gln Lys Val Pro Ala Phe Ile Asp Glu Thr Leu Ala Ala Lys 580	585	590
	Gly Ala Glu Asn Ile Ala Asp Arg Gly Glu Ala Asp Ala Ser Asp Asp 595	600	605
35	Phe Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Trp Arg Glu His Met Trp Ser Asp Val 610	615	620
40	Ala Ala Tyr Phe Asn Leu Asp Ile Glu Asn Ser Glu Asp Asn Lys Ser 625	630	635 640
	Thr Leu Ser Leu Gln Phe Val Asp Ser Ala Ala Asp Met Pro Leu Ala 645	650	655
45	Lys Met His Gly Ala Phe Ser Thr Asn Val Val Ala Ser Lys Glu Leu 660	665	670
	Gln Gln Pro Gly Ser Ala Arg Ser Thr Arg His Leu Glu Ile Glu Leu 675	680	685
50	Pro Lys Glu Ala Ser Tyr Gln Glu Gly Asp His Leu Gly Val Ile Pro 690	695	700
55	Arg Asn Tyr Glu Gly Ile Val Asn Arg Val Thr Ala Arg Phe Gly Leu 705	710	715 720
	Asp Ala Ser Gln Gln Ile Arg Leu Glu Ala Glu Glu Glu Lys Leu Ala 725	730	735
60	His Leu Pro Leu Ala Lys Thr Val Ser Val Glu Glu Leu Leu Gln Tyr 740	745	750
65	Val Glu Leu Gln Asp Pro Val Thr Arg Thr Gln Leu Arg Ala Met Ala 755	760	765
	Ala Lys Thr Val Cys Pro Pro His Lys Val Glu Leu Glu Ala Leu Leu		

DE 199 55 605 A 1

770	775	780	
Glu Lys Gln Ala Tyr Lys Glu Gln Val Leu Ala Lys Arg Leu Thr Met 785 790 795 800			5
Leu Glu Leu Leu Glu Lys Tyr Pro Ala Cys Glu Met Lys Phe Ser Glu 805 810 815			
Phe Ile Ala Leu Leu Pro Ser Ile Arg Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile Ser 820 825 830			10
Ser Ser Pro Arg Val Asp Glu Lys Gln Ala Ser Ile Thr Val Ser Val 835 840 845			15
Val Ser Gly Glu Ala Trp Ser Gly Tyr Gly Glu Tyr Lys Gly Ile Ala 850 855 860			
Ser Asn Tyr Leu Ala Glu Leu Gln Glu Gly Asp Thr Ile Thr Cys Phe 865 870 875 880			20
Ile Ser Thr Pro Gln Ser Glu Phe Thr Leu Pro Lys Asp Pro Glu Thr 885 890 895			25
Pro Leu Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg Gly 900 905 910			
Phe Val Gln Ala Arg Lys Gln Leu Lys Glu Gln Gly Gln Ser Leu Gly 915 920 925			30
Glu Ala His Leu Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Pro His Glu Asp Tyr Leu 930 935 940			35
Tyr Gln Glu Glu Leu Glu Asn Ala Gln Ser Glu Gly Ile Ile Thr Leu 945 950 955 960			
His Thr Ala Phe Ser Arg Met Pro Asn Gln Pro Lys Thr Tyr Val Gln 965 970 975			40
His Val Met Glu Gln Asp Gly Lys Lys Leu Ile Glu Leu Leu Asp Gln 980 985 990			
Gly Ala His Phe Tyr Ile Cys Gly Asp Gly Ser Gln Met Ala Pro Ala 995 1000 1005			45
Val Glu Ala Thr Leu Met Lys Ser Tyr Ala Asp Val His Gln Val Ser 1010 1015 1020			50
Glu Ala Asp Ala Arg Leu Trp Leu Gln Gln Leu Glu Glu Lys Gly Arg 1025 1030 1035 1040			
Tyr Ala Lys Asp Val Trp Ala Gly 1045			55
<210> 3			60
<211> 30			
<212> DNA			
<213> Künstliche Sequenz			
<220>			65
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer			

<400> 3
 gcaggagacg gggtggnnac aagctggacg 30

5
 <210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

10
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

15
 <400> 4
 cgtccagctt gtanncaacc cgtctcctgc 30

20
 <210> 5
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

25
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 5
 gaagcaatga acaagnnnca gcgagcaaat ccag 34

30
 <210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

35
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

40
 <400> 6
 ctggattgc tcgctggnnc ttgttcattg 30

45
 <210> 7
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

50
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 7
 gctttgataa aaacttaaag tcaannnctt aaatttgat g 41

55
 <210> 8
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

60
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

65
 <400> 8
 cgtacaaatt taagnnnttg acttaagttt ttatcaaagc 40

DE 199 55 605 A 1

<210> 9
 <211> 1049
 <212> PRT
 <213> Bacillus megaterium 5

<400> 9
 Met Thr Ile Lys Glu Met Pro Gln Pro Lys Thr Phe Gly Glu Leu Lys
 1 5 10 15 10

Asn Leu Pro Leu Leu Asn Thr Asp Lys Pro Val Gln Ala Leu Met Lys
 20 25 30

Ile Ala Asp Glu Leu Gly Glu Ile Phe Lys Phe Glu Ala Pro Gly Arg
 35 40 45 15

Val Thr Arg Tyr Leu Ser Ser Gln Arg Leu Ile Lys Glu Ala Cys Asp
 50 55 60

Glu Ser Arg Phe Asp Lys Asn Leu Ser Gln Ala Leu Lys Phe Val Arg
 65 70 75 80 20

Asp Phe Ala Gly Asp Gly Leu Phe Thr Ser Trp Thr His Glu Lys Asn
 85 90 95 25

Trp Lys Lys Ala His Asn Ile Leu Leu Pro Ser Phe Ser Gln Gln Ala
 100 105 110

Met Lys Gly Tyr His Ala Met Met Val Asp Ile Ala Val Gln Leu Val
 115 120 125 30

Gln Lys Trp Glu Arg Leu Asn Ala Asp Glu His Ile Glu Val Pro Glu
 130 135 140 35

Asp Met Thr Arg Leu Thr Leu Asp Thr Ile Gly Leu Cys Gly Phe Asn
 145 150 155 160

Tyr Arg Phe Asn Ser Phe Tyr Arg Asp Gln Pro His Pro Phe Ile Thr
 165 170 175 40

Ser Met Val Arg Ala Leu Asp Glu Ala Met Asn Lys Leu Gln Arg Ala
 180 185 190 45

Asn Pro Asp Asp Pro Ala Tyr Asp Glu Asn Lys Arg Gln Phe Gln Glu
 195 200 205

Asp Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Val Asp Lys Ile Ile Ala Asp Arg
 210 215 220 50

Lys Ala Ser Gly Glu Gln Ser Asp Asp Leu Leu Thr His Met Leu Asn
 225 230 235 240

Gly Lys Asp Pro Glu Thr Gly Glu Pro Leu Asp Asp Glu Asn Ile Arg
 245 250 255 55

Tyr Gln Ile Ile Thr Phe Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Ser Gly
 260 265 270 60

Leu Leu Ser Phe Ala Leu Tyr Phe Leu Val Lys Asn Pro His Val Leu
 275 280 285

Gln Lys Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Val Leu Val Asp Pro Val Pro
 290 295 300 65

DE 199 55 605 A 1

	Ser	Tyr	Lys	Gln	Val	Lys	Gln	Leu	Lys	Tyr	Val	Gly	Met	Val	Leu	Asn	305	310	315	320
5	Glu	Ala	Leu	Arg	Leu	Trp	Pro	Thr	Ala	Pro	Ala	Phe	Ser	Leu	Tyr	Ala	325	330	335	
	Lys	Glu	Asp	Thr	Val	Leu	Gly	Gly	Glu	Tyr	Pro	Leu	Glu	Lys	Gly	Asp	340	345	350	
10	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Ile	Pro	Gln	Leu	His	Arg	Asp	Lys	Thr	Ile	Trp	355	360	365	
15	Gly	Asp	Asp	Val	Glu	Glu	Phe	Arg	Pro	Glu	Arg	Phe	Glu	Asn	Pro	Ser	370	375	380	
	Ala	Ile	Pro	Gln	His	Ala	Phe	Lys	Pro	Phe	Gly	Asn	Gly	Gln	Arg	Ala	385	390	395	400
20	Cys	Ile	Gly	Gln	Gln	Phe	Ala	Leu	His	Glu	Ala	Thr	Leu	Val	Leu	Gly	405	410	415	
25	Met	Met	Leu	Lys	His	Phe	Asp	Phe	Glu	Asp	His	Thr	Asn	Tyr	Glu	Leu	420	425	430	
	Asp	Ile	Lys	Glu	Thr	Leu	Thr	Leu	Lys	Pro	Glu	Gly	Phe	Val	Val	Lys	435	440	445	
30	Ala	Lys	Ser	Lys	Lys	Ile	Pro	Leu	Gly	Gly	Ile	Pro	Ser	Pro	Ser	Thr	450	455	460	
35	Glu	Gln	Ser	Ala	Lys	Lys	Val	Arg	Lys	Lys	Ala	Glu	Asn	Ala	His	Asn	465	470	475	480
	Thr	Pro	Leu	Leu	Val	Leu	Tyr	Gly	Ser	Asn	Met	Gly	Thr	Ala	Glu	Gly	485	490	495	
40	Thr	Ala	Arg	Asp	Leu	Ala	Asp	Ile	Ala	Met	Ser	Lys	Gly	Phe	Ala	Pro	500	505	510	
45	Gln	Val	Ala	Thr	Leu	Asp	Ser	His	Ala	Gly	Asn	Leu	Pro	Arg	Glu	Gly	515	520	525	
	Ala	Val	Leu	Ile	Val	Thr	Ala	Ser	Tyr	Asn	Gly	His	Pro	Pro	Asp	Asn	530	535	540	
50	Ala	Lys	Gln	Phe	Val	Asp	Trp	Leu	Asp	Gln	Ala	Ser	Ala	Asp	Glu	Val	545	550	555	560
	Lys	Gly	Val	Arg	Tyr	Ser	Val	Phe	Gly	Cys	Gly	Asp	Lys	Asn	Trp	Ala	565	570	575	
55	Thr	Thr	Tyr	Gln	Lys	Val	Pro	Ala	Phe	Ile	Asp	Glu	Thr	Leu	Ala	Ala	580	585	590	
60	Lys	Gly	Ala	Glu	Asn	Ile	Ala	Asp	Arg	Gly	Glu	Ala	Asp	Ala	Ser	Asp	595	600	605	
	Asp	Phe	Glu	Gly	Thr	Tyr	Glu	Glu	Trp	Arg	Glu	His	Met	Trp	Ser	Asp	610	615	620	
65	Val	Ala	Ala	Tyr	Phe	Asn	Leu	Asp	Ile	Glu	Asn	Ser	Glu	Asp	Asn	Lys	625	630	635	640

DE 199 55 605 A 1

Ser	Thr	Leu	Ser	Leu	Gln	Phe	Val	Asp	Ser	Ala	Ala	Asp	Met	Pro	Leu		
				645					650					655			
Ala	Lys	Met	His	Gly	Ala	Phe	Ser	Thr	Asn	Val	Val	Ala	Ser	Lys	Glu		5
			660					665					670				
Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ser	Ala	Arg	Ser	Thr	Arg	His	Leu	Glu	Ile	Glu		10
		675					680					685					
Leu	Pro	Lys	Glu	Ala	Ser	Tyr	Gln	Glu	Gly	Asp	His	Leu	Gly	Val	Ile		
	690					695					700						
Pro	Arg	Asn	Tyr	Glu	Gly	Ile	Val	Asn	Arg	Val	Thr	Ala	Arg	Phe	Gly		15
705				710					715						720		
Leu	Asp	Ala	Ser	Gln	Gln	Ile	Arg	Leu	Glu	Ala	Glu	Glu	Glu	Lys	Leu		
			725					730						735			20
Ala	His	Leu	Pro	Leu	Ala	Lys	Thr	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Leu	Gln		
			740					745					750				
Tyr	Val	Glu	Leu	Gln	Asp	Pro	Val	Thr	Arg	Thr	Gln	Leu	Arg	Ala	Met		25
	755					760					765						
Ala	Ala	Lys	Thr	Val	Cys	Pro	Pro	His	Lys	Val	Glu	Leu	Glu	Ala	Leu		
	770					775					780						30
Leu	Glu	Lys	Gln	Ala	Tyr	Lys	Glu	Gln	Val	Leu	Ala	Lys	Arg	Leu	Thr		
785				790					795						800		
Met	Leu	Glu	Leu	Leu	Glu	Lys	Tyr	Pro	Ala	Cys	Glu	Met	Lys	Phe	Ser		35
			805					810						815			
Glu	Phe	Ile	Ala	Leu	Leu	Pro	Ser	Ile	Arg	Pro	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ile		
		820					825					830					
Ser	Ser	Ser	Pro	Arg	Val	Asp	Glu	Lys	Gln	Ala	Ser	Ile	Thr	Val	Ser		40
		835					840					845					
Val	Val	Ser	Gly	Glu	Ala	Trp	Ser	Gly	Tyr	Gly	Glu	Tyr	Lys	Gly	Ile		
	850					855					860						45
Ala	Ser	Asn	Tyr	Leu	Ala	Glu	Leu	Gln	Glu	Gly	Asp	Thr	Ile	Thr	Cys		
865				870					875						880		
Phe	Ile	Ser	Thr	Pro	Gln	Ser	Glu	Phe	Thr	Leu	Pro	Lys	Asp	Pro	Glu		50
			885					890					895				
Thr	Pro	Leu	Ile	Met	Val	Gly	Pro	Gly	Thr	Gly	Val	Ala	Pro	Phe	Arg		
		900					905						910				
Gly	Phe	Val	Gln	Ala	Arg	Lys	Gln	Leu	Lys	Glu	Gln	Gly	Gln	Ser	Leu		55
	915					920						925					
Gly	Glu	Ala	His	Leu	Tyr	Phe	Gly	Cys	Arg	Ser	Pro	His	Glu	Asp	Tyr		60
	930					935					940						
Leu	Tyr	Gln	Glu	Glu	Leu	Glu	Asn	Ala	Gln	Ser	Glu	Gly	Ile	Ile	Thr		
945				950					955						960		
Leu	His	Thr	Ala	Phe	Ser	Arg	Met	Pro	Asn	Gln	Pro	Lys	Thr	Tyr	Val		65
			965					970						975			

Gln His Val Met Glu Gln Asp Gly Lys Lys Leu Ile Glu Leu Leu Asp
 980 985 990

5 Gln Gly Ala His Phe Tyr Ile Cys Gly Asp Gly Ser Gln Met Ala Pro
 995 1000 1005

Ala Val Glu Ala Thr Leu Met Lys Ser Tyr Ala Asp Val His Gln Val
 1010 1015 1020

10 Ser Glu Ala Asp Ala Arg Leu Trp Leu Gln Gln Leu Glu Glu Lys Gly
 1025 1030 1035 1040

15 Arg Tyr Ala Lys Asp Val Trp Ala Gly
 1045

Patentansprüche

- 20 1. Cytochrom P450 Monooxygenase, welche zur Oxidation N-heterocyclischer zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen befähigt ist. (LÖSLICH)
2. Monooxygenase nach Anspruch 1, deren Substrat-bindender Bereich durch ortsspezifische Mutagenese zur funktionalen Aufnahme des N-heterocyclischen Substrats befähigt ist.
3. Monooxygenase nach Anspruch 1 oder 2, abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenasen bakteriellen Ursprungs.
- 25 4. Monooxygenase nach Anspruch 3, abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenase BM-3 aus *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2, welche wenigstens eine funktionelle Mutation in einem der Aminosäuresequenzbereiche 172-224, 39-43, 48-52, 67-70, 330-335, 352-356, 73-82 und 86-88 aufweist.
5. Monooxygenase nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie wenigstens eine der folgenden ein- oder
- 30 mehrfachen Aminosäuresubstitutionen aufweist:
 - a) Phe87Val;
 - b) Phe87Val, Leu188Gln; oder
 - c) Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly;
 sowie funktionale Äquivalente davon.
- 35 6. Nukleinsäuresequenz, kodierend für eine Monooxygenase nach einem der vorherigen Ansprüche.
7. Expressionskonstrukt, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine kodierende Sequenz, welche eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 6 umfasst.
8. Vektor, umfassend wenigstens ein Expressionskonstrukt nach Anspruch 7.
9. Rekombinanter Mikroorganismus, transformiert mit wenigstens einem Vektor nach Anspruch 8.
- 40 10. Mikroorganismus nach Anspruch 9, ausgewählt unter Bakterien der Gattung *Escherichia*.
11. Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation N-heterocyclischer zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a1) einen rekombinanten Mikroorganismus nach Anspruch 9 oder 10 in einem Kulturmedium, gegebenenfalls in Gegenwart eines Substrats, kultiviert; oder
 - 45 a2) ein Substrat-haltiges Reaktionsmedium mit einem Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 5 inkubiert; und
 - b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man aus dem Medium das gebildete Indol und und/oder Indirubin isoliert.
- 50 13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß man die Indoloxidation durch Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 30 bis 40°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 kultiviert.
14. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß man die Indoloxidation durch enzymatische Umsetzung eines Indol-haltiges Mediums bei einer Temperatur von etwa 30 bis 40°C und einem pH-Wert von etwa
- 55 6 bis 9 durchführt, wobei das Indol-haltige Medium außerdem bezogen auf Indol einen etwa 10- bis 100fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten enthält.
15. Bioreaktor, umfassend ein Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder einen rekombinanten Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 9 oder 10 in immobilisierter Form.
16. Verwendung einer Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der Ansprüche 1 bis 5, eines Vektors nach Anspruch 8, oder eines Mikroorganismus nach Anspruch 9 oder 10 zur mikrobiologischen Oxidation N-heterocyclischer zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen.
- 60 17. Verwendung nach Anspruch 16 zur Herstellung von Indigo und/oder Indirubin.